

Boletim de Pesquisa 213

e Desenvolvimento ISSN 1676 - 340

Dezembro, 2007

Influência de *Trichoderma* spp. sobre o
crescimento de *Sclerotium rolfsii*



Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 213

Influência de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento de *Sclerotium rolfsii*

Macedo, M.A.

Martins, I.

Delgado, G.V.

Mello, S.C.M.

Menêzes, J.E.

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624 <http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica:

1ª edição

1ª impressão (2007):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

- I 43 Influência de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento de *Sclerotium rolfsii* / M.A. Macedo ... [et al.]. -- Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.
11 p. -- (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 - 1340; 213).

1. *Trichoderma* spp - crescimento - *Sclerotium rolfsii* - influência. 2. Controle biológico. I. Macedo, M. A. II. Série.

632.96 - CDD 21.

Influência de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento de *Sclerotium rolfsii*

Macedo, M.A.¹

Martins, I.²

Delgado, G.V.³

Mello, S.C.M.⁴

Menêzes, J.E.⁵

Resumo

Espécies do gênero *Trichoderma* apresentam efeitos sobre vários patógenos do solo, que causam doenças nas plantas. O fitopatógeno *Sclerotium rolfsii* possui alta capacidade de permanência no solo, na forma de escleródios. Os sintomas causados pelo *S. rolfsii* são murchas, tombamento, podridão de raízes e escurecimento da região do colo da planta. O controle da doença tem se baseado no manejo cultural, de forma a reduzir o potencial de inóculo, uma vez que, o uso de fungicidas químicos não apresenta resultados satisfatórios. O trabalho teve como objetivo avaliar e selecionar isolados de *Trichoderma* com potencial para serem utilizados no biocontrole desse patógeno. Foram utilizados 12 isolados de *Trichoderma* e um isolado de *S. rolfsii*. A influência de *Trichoderma* sobre o patógeno foi avaliada a partir dos testes: cultivo pareado, metabólitos voláteis, porcentagem de formação e germinação de escleródios obtidos do cultivo pareado. Os isolados CEN 219, CEN 277, CEN 279, CEN 281, CEN 284 e CEN 286 de *Trichoderma* inibem o desenvolvimento micelial, apresentando potencial antagonista contra o *S. rolfsii*. Os isolados de *Trichoderma* são produtores de antibióticos voláteis, que inibem o desenvolvimento colonial de *S. rolfsii*. Os escleródios de *S. rolfsii* formados em presença dos isolados de *Trichoderma* mantém sua capacidade de germinação, após 14 dias de pareamento.

¹ Agronomia, graduanda, Universidade de Brasília - UnB

² Biologia, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³ Agronomia, graduando, Universidade de Brasília - UnB

⁴ Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁵ Eng. Agr , M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

INTRODUÇÃO

O elevado custo do controle químico, a perda de eficiência de alguns desses produtos, aliado aos problemas ambientais resultantes destas práticas, levam a busca de alternativas para o controle de fitopatógenos. Neste contexto, destaca-se a utilização de agentes de biocontrole (Michereff, 2005).

A pesquisa em biofungicidas é uma área relativamente nova e tem-se mostrado bastante promissora, destacando espécies de fungos do gênero *Trichoderma*, dentre os princípios ativos mais utilizados. Este antagonista apresenta características que o tornam vantajoso como agente de biocontrole. Pela sua grande capacidade saprofítica, aliada à baixa exigência nutricional, ele é capaz de colonizar rapidamente o substrato e, de produzir clamidósporos, que são estruturas de resistência, consegue sobreviver no ambiente sob condições adversas.

Espécies do gênero *Trichoderma* apresentam efeitos diretos e indiretos na população microbiana do solo, que levam ao controle biológico. Os efeitos diretos são: competição por espaço físico e por nutrientes, produção de antibióticos e enzimas hidrolíticas, eliminação das enzimas do patógeno e parasitismo. Dentre os efeitos indiretos incluem aspectos que produzem mudanças bioquímicas e morfológicas na planta alvo do fitopatógeno (Félix, 2006).

O fungo *Sclerotium rolfsii* Sacc possui alta capacidade de permanência no solo e larga gama de hospedeiros no reino vegetal, atacando aproximadamente 200 espécies de plantas, em cerca de 100 famílias botânicas. A sobrevivência deste fungo no solo se dá, principalmente, através de estruturas de resistência, chamados de escleródios, e em restos de cultura. Os escleródios permanecem no solo por mais de cinco anos (Marreto 1997). Em geral, os sintomas causados pelo *S. rolfsii* são murchas das plantas, tombamento, podridão de raízes, escurecimento da região do colo da planta. As partes afetadas podem exibir um micélio branco de aspecto cotonoso, junto à superfície do solo. Com o avanço da doença, observa-se a formação dos escleródios, responsáveis pela disseminação da doença, que são esféricos (2 mm de diâmetro), rígidos, inicialmente de coloração branca, e, posteriormente, tornam-se marrons (Instituto Biológico, 2007).

O controle da doença tem se baseado no manejo cultural, de forma a reduzir o potencial de inóculo, uma vez que, por se tratar de um patógeno de solo, o uso de fungicidas químicos, além de dispendioso, não apresenta resultados satisfatórios.

Diante disto, este trabalho teve como objetivo avaliar e selecionar isolados de *Trichoderma* spp. com potencial para serem utilizados no biocontrole de *S. rolfsii*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 12 isolados de *Trichoderma* spp. (CEN 277, CEN 278, CEN 279, CEN 280, CEN 281, CEN 282, CEN 283, CEN 284, CEN 285, CEN 286, CEN 209, CEN 219) e um isolado do fitopatógeno *Sclerotium rolfsii* (CEN 216) pertencentes à Coleção de Fungos Fitopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Todos os isolados foram cultivados em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), em placas de Petri. O crescimento foi realizado em câmara incubadora tipo BOD à temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12 horas.

A influência de *Trichoderma* sobre o patógeno foi avaliada a partir dos seguintes testes: cultivo pareado, metabólitos voláteis, porcentagem de formação e germinação de escleródios obtidos do cultivo pareado.

CULTIVO PAREADO

O cultivo pareado foi realizado em placas de Petri, contendo meio BDA. Discos de micélio de 5 mm de diâmetro de *S. rolfsii* e do antagonista foram transferidos para placa, contendo um disco de cada fungo, os quais foram dispostos em lados opostos da placa a 1 cm da margem. As placas foram mantidas em BOD sobre temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. O potencial de controle do *Trichoderma* sobre o *S. rolfsii* foi determinado aos 7 e aos 14 dias, a partir de medições do diâmetro das colônias, calculando-se os valores médios de porcentagem de inibição, em relação à testemunha. Também, foram atribuídas notas baseadas na escala de 1 a 5 (Bell et al., 1982) para diferenciação de níveis de antagonismo (notas: 1: controle total, 2: controle de 75%, 3: controle de 50%, 4: controle de até 25%, 5: ausência de controle). O experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

METABÓLITOS VOLÁTEIS

Todos os isolados do antagonista foram utilizados para estudar a inibição do crescimento do patógeno por meio de compostos voláteis, que, eventualmente, são produzidos pelo antagonista. O método utilizado foi o de placas sobrepostas. Discos de micélio de 5 mm de diâmetro do patógeno e do antagonista foram inoculados separadamente em meio BDA no centro de placas de Petri. Após 24 horas, as placas contendo o fitopatógeno foram sobrepostas às do antagonista, e ambas foram unidas por filme de PVC para impedir o escape de metabólitos voláteis. Como testemunha, placas inoculadas com o patógeno

foram sobrepostas a outras contendo meio BDA. A incubação foi feita em BOD, na temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$, por nove dias, com fotoperíodo de 12 horas. Para a avaliação do crescimento micelial, mediu-se o diâmetro das colônias a cada três dias. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de comparação de médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

FORMAÇÃO E GERMINAÇÃO DE ESCLERÓDIOS

Após 14 dias de confronto do patógeno e antagonista, pelo método de culturas pareadas, em meio de BDA, foram coletados e contados os escleródios de *S. rolfsii* produzidos em cada placa de Petri. Foram selecionados 10 escleródios de cada placa, para avaliação da viabilidade. Os escleródios foram submetidos a tríplice esterilização com solução de hipoclorito a 20%, durante 30 segundos, sendo que, os tratamentos com hipoclorito foram intercalados com lavagens em água esterilizada. Ao final desse processo, os escleródios foram colocados na superfície de meio BDA, cada placa recebendo cinco escleródios. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso com oito repetições. As avaliações foram feitas diariamente até que todos os escleródios germinassem, o que ocorreu ao final do terceiro dia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos resultados obtidos no cultivo pareado o isolado CEN 286 proporcionou a maior redução do crescimento de colônia do patógeno, porém não houve diferença estatística dos isolados CEN 219, CEN 284, CEN 279, CEN 277, CEN 281, CEN 285 e CEN 283. Resultados de inibição do crescimento do *S. rolfsii* por outros isolados de *Trichoderma* foram encontrados em teste de pareamento por Mello et al. (2007).

Pela escala adotada, os melhores isolados foram: CEN 219, CEN 281, CEN 286 e CEN 284, para os quais foi atribuída a nota um (Fig. 1). São mostrados os isolados CEN 284 e CEN 277, quanto à inibição do crescimento do patógeno pelo antagonista, aos quais foram dadas as notas 1 e 2, respectivamente, e a testemunha (Fig. 2).

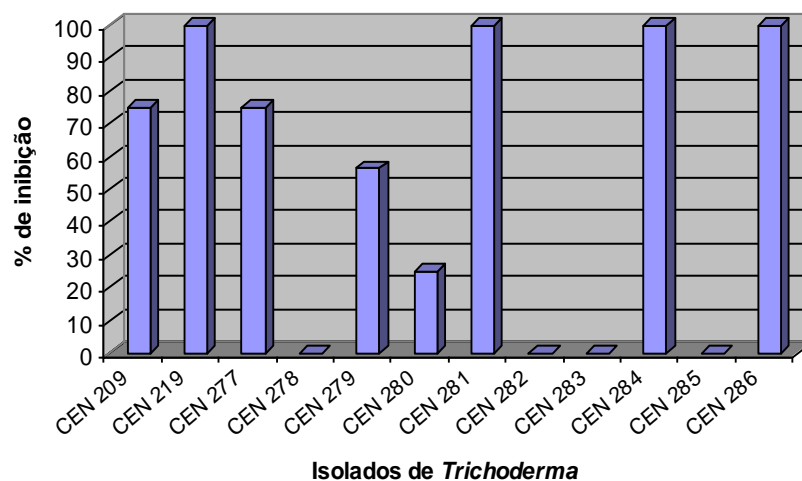


Fig. 1. Porcentagens de inibição dos isolados de *Trichoderma* sobre *S. rolfsii* em cultivo pareado de acordo com a escala de Bell et al. (1982).

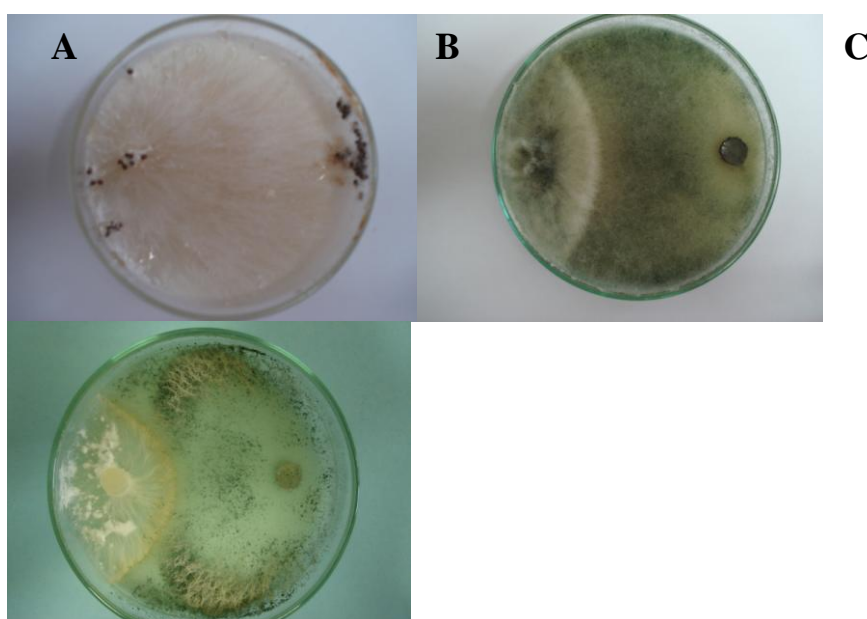


Fig. 2. Inibição do crescimento do patógeno pelo antagonista: A) Testemunha *S. rolfsii*, B) *S.rolfsii* x CEN 284, C) *S. rolfsii* x CEN 277 de acordo com a escala adotada.

Quanto à produção de metabólitos voláteis todos os isolados inibiram o crescimento das colônias do *S. rolfsii*, sendo que CEN 277 e CEN 278 proporcionaram o maior percentual de inibição (Fig. 3). Não houve formação de escleródios na superfície das colônias, no período de tempo estudado. São mostrados os isolados CEN 278 e CEN 284, quanto a inibição do crescimento micelial do patógeno pelo antagonista, (Fig. 4).

Vale ressaltar que os metabólitos encontrados sob condições controladas podem se distinguir funcional e quantitativamente daqueles presentes em campo, devido a diversos fatores: variação das condições abióticas, como temperatura e umidade; condições nutricionais; e, adsorção das moléculas por partículas do solo. Além disso, a ação antagonista pode resultar do efeito sinérgico resultante de dois ou mais mecanismos agindo simultaneamente. Assim, faz-se necessário avaliar os isolados em casa de vegetação e campo para verificar a efetividade do controle verificado *in vitro*.

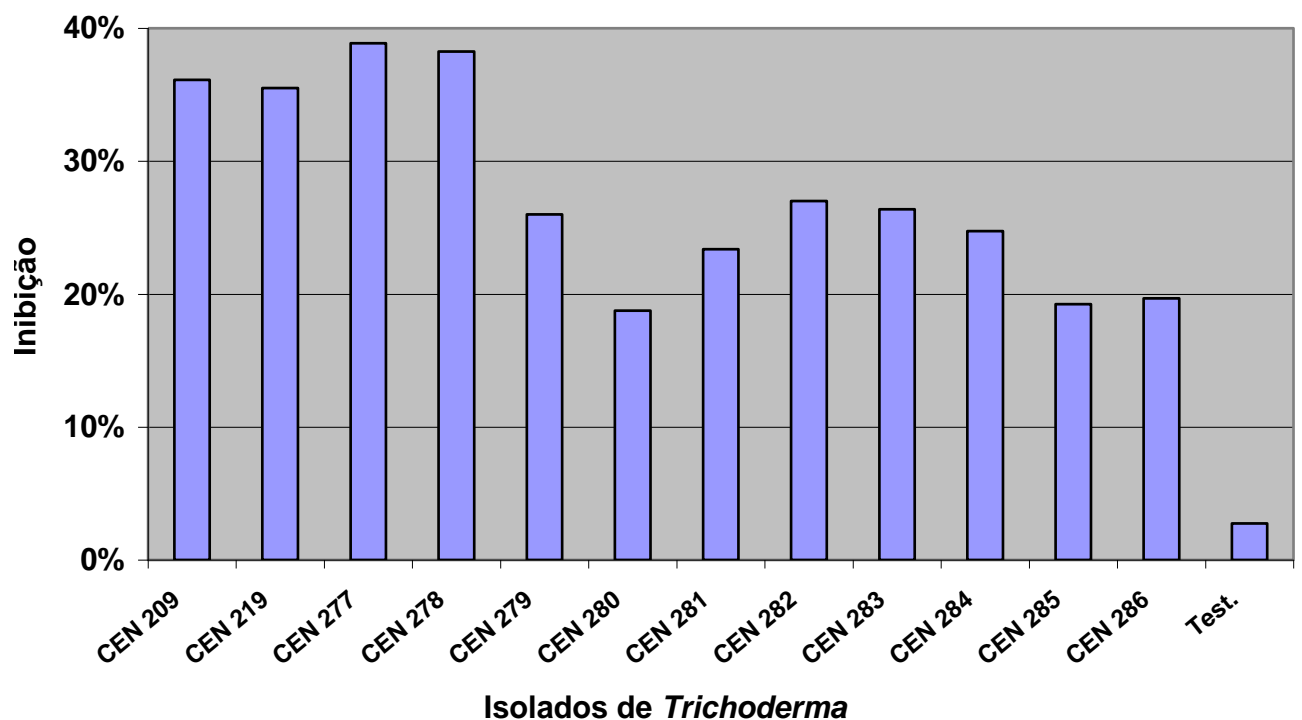


Fig. 3. Porcentagem de inibição do crescimento de micélio de *S. rolfsii* sob influência de *Trichoderma* spp.

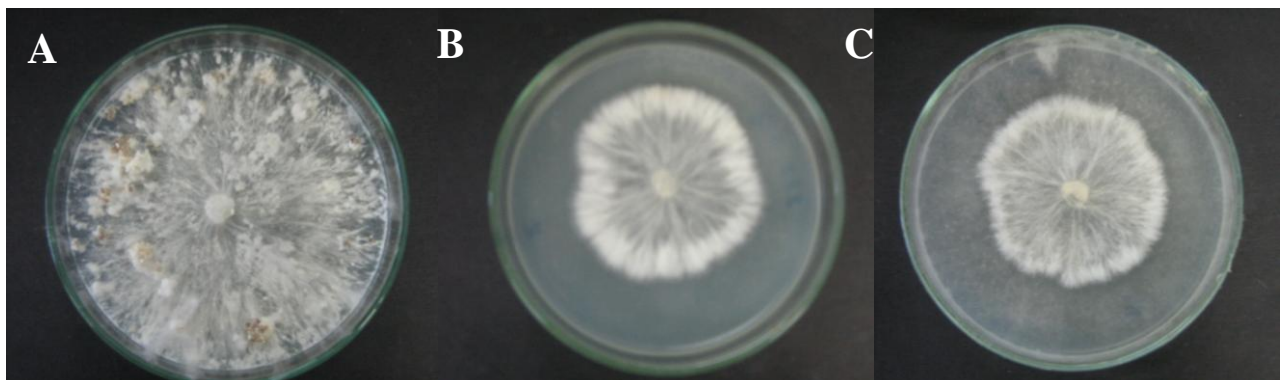


Fig. 4. Produção de metabólitos voláteis por isolados de *Trichoderma*: A) Testemunha *S. rolfsii*, B) CEN 278, C) CEN 284.

Os isolados que mais inibiram a formação de escleródios no cultivo pareado foram CEN 281 e CEN 219. No entanto, os isolados CEN 277 e CEN 284 também reduziram a produção destes propágulos, evidenciando o efeito desses isolados de *Trichoderma* na redução do potencial de inóculo de *S. rolfsii*. Silveira et al. (1994) verificaram que os isolados evidenciaram capacidade variável de inibir o crescimento micelial e produção de escleródios de *S. rolfsii*. Resultados semelhantes sobre o maior efeito antagônico apresentado pelo *Trichoderma* spp. na produção de *S. rolfsii*, assemelha-se aos observados por Lee & Wu (1984) nas interações entre *S. esclerotiorum* e *T. viride*.

Quanto à germinação dos escleródios produzidos, após 24 horas de incubação em meio BDA, o isolado CEN 209 apresentou uma porcentagem de germinação de 28,5%, enquanto a testemunha obteve 80% de germinação. Entretanto, após 72 horas, a germinação foi de 100%, independentemente do isolado de *Trichoderma* utilizado no pareamento.

O uso de agentes de biocontrole é uma alternativa promissora, porém ainda há muito a ser estudado para que esta técnica seja consolidada, tornando-se mais segura a ponto de ganhar a confiança do produtor e ser usada em substituição aos produtos químicos para o controle de doenças.

CONCLUSÕES

Os isolados CEN 219, CEN 277, CEN 279, CEN 281, CEN 284 e CEN 286 de *Trichoderma* inibem o desenvolvimento micelial, apresentando potencial antagonista contra o *S. rolfsii*.

Os isolados de *Trichoderma* spp. são produtores de antibióticos voláteis, que inibem o desenvolvimento colonial de *S. rolfsii*.

Os escleródios de *S. rolfsii* formados em presença dos isolados de *Trichoderma* mantêm sua capacidade de germinação, após 14 dias de pareamento.

A formação de escleródios de *S. rolfsii* é inibida em presença dos isolados CEN 219, CEN 281, CEN 277 e CEN 284 de *Trichoderma*.

O isolado CEN 209 apresenta uma porcentagem de germinação de 28,5%, após 24 horas.

REFERÊNCIAS

Barreto, M. Doenças do amendoim. In: KIMATI, H.; AMORIM, L; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Doenças de plantas cultivadas**. Manual de fitopatologia, v. 2, 1997. p.65-77.

Bell, D.K.; Wellls, H.D.; Markham, C.R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, p. 379-382, 1982.

Félix, C.R. A importância de enzimas hidrolíticas em controle biológico. In: LAUMANN, R.A.; SILVA, J.B.T. **Ciclo de seminários do núcleo temático de controle biológico**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. p. 33-34. (Documentos 201).

INSTITUTO BIOLÓGICO. Disponível em <http://www.biologico.sp.gov.br/>. Acessado em 11 de julho de 2007.

Lee, Y.; Wu, W. The antagonism of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens* against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Protection Bulletin**, v. 26, p. 293-304, 1984.

Mello, S.C.M. Fungos como agentes de controle biológico de fitopatógenos com ênfase em *Trichoderma* spp. In: LAUMANN, R.A.; SILVA, J.B.T. **Ciclo de seminários do núcleo temático de controle biológico**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. p. 31-32. (Documentos 201).

Mello, S.C.M.; Ávila, Z.R.; Braúna, L.M.; Pádua, R.R.; Gomes, D. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Fitosanidad**, v. 11, n. 1m p. 3-9, 2007.

Michereff, S.J. **Controle biológico de doenças de plantas**. Disponível em: www.ufrpe.br.

Silveira, N.S.S.; Michereffi, S.J.; Menezes, M.; Takaki, G.M.C. Potencial de isolados de *Trichoderma* spp. no controle de *Sclerotium rolfsii* em feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 20, n. 1, p. 22-25, 1994.